

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

REC'D 07 NOV 2000

WIPO

PCT

EPO - Munich
62

23. Okt. 2000

EP 00107807

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

4

Aktenzeichen: 199 37 957.2

Anmeldetag: 11. August 1999

Anmelder/Inhaber: SunGene GmbH & Co KGaA, Gatersleben/DE

Erstanmelder: BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Homogentisat-Dioxygenase

IPC: C 12 N, A 01 H

Bemerkung: Die nachgereichte Zeichnung Figur 5 ist am
28. Februar 2000 eingegangen.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 4. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoß

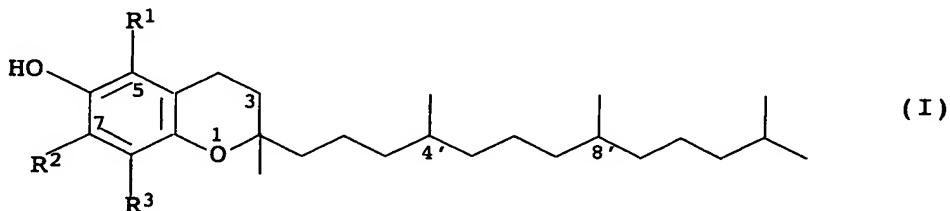
Homogentisat-Dioxygenase

- Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige genetische Konstrukte, wie Expressionskassetten und Vektoren, zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt, damit hergestellte transgene Pflanzen sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt.
- 10 Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. mit erhöhtem Tocopherol (Vitamin E)-Gehalt.

15

- Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) umfaßt 20 die Tocopherole (I), die zweite Gruppe (2a-d) umfaßt die Tocotrienole (II):

25

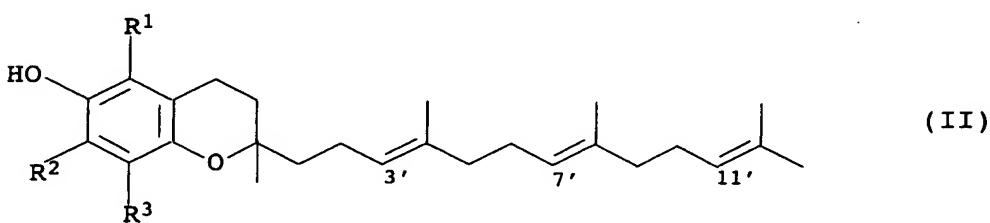


30

- 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$,
 1b, β -Tocopherol: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 1c, γ -Tocopherol: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1d, δ -Tocopherol: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

35

40



- 2a, α -Tocotrienol
 2b, β -Tocotrienol
 45 2c, γ -Tocotrienol
 2d, δ -Tocotrienol

wobei

R¹, R² und R³ wie oben definiert sind.

Wirtschaftlich größte Bedeutung besitzt derzeit alpha-Tocopherol.

5

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur 10 diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch 15 wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, die für die Tocopherol-Syntheseleistung kodierenden, essentiellen 20 Biosynthesegene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthesewege und deren Regulation bekannt sind und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

25

Der Tocopherolsyntheteweg in Pflanzen ist schematisch in beiliegender Figur 1 dargestellt. Im Stand der Technik gibt es bisher keinen brauchbaren Ansatz, der eine gezielte Erhöhung der Tocopherol-Biosynthese in Pflanzen gestattet.

30

Kurze Beschreibung der Erfindung:

Es ist deshalb Aufgabe der Erfindung Mittel bereitzustellen, mit deren Hilfe eine verbesserte Tocopherol-Biosynthese erreicht 35 werden kann.

Diese Aufgabe konnte erfindungsgemäß überraschenderweise durch die Bereitstellung von genetischen Konstrukten gelöst werden, mit deren Hilfe die Biosynthese von Homogentisat, einem 40 Tocopherol-Vorläufer, und damit die Bildung von Tocopherol erhöht werden kann. Gleichzeitig kann erfindungsgemäß der unerwünschte Abfluß von Homogentisat zu Maleylacetoacetat unterbunden und damit die Tocopherolsynthese weiter verbessert werden.

45

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft daher eine Expressionskassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen

- 5 a) die kodierende Nukleinsäuresequenz für 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) oder für ein funktionales Äquivalent davon, wodurch bei Expression die Homogentisat-Biosyntheserate erhöht wird; und/oder
b) eine Nukleinsäuresequenz (anti-HGD), welche zu einer anti-sense-Nukleinsäuresequenz transkribierbar ist, die zur Inhibition der Homogentisat-Dioxygenase (HGD)-Aktivität befähigt ist, z.B. indem sie die Expression von endogener HGD inhibiert.
- 10 15 "Inhibition" ist in diesem Zusammenhang weit auszulegen und umfaßt die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der HGD-Enzymaktivität in der mit einem erfindungsgemäßen anti-HGD-Konstrukt transformierten
20 Pflanze oder dem Pflanzenteil oder Gewebe. Eine Inhibition im Sinne der Erfindung umfaßt auch eine mengenmäßige Verringerung von aktiver HGD in der Pflanze, bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von HGD-Enzymaktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit
25 von HGD) von HGD-Protein.

Vorzugsweise ist dabei die kodierende HPPD-Sequenz mit der kodierenden Sequenz eines Pflanzenorganell-spezifischen Transitpeptids funktional verknüpft. Das Transitpeptid besitzt
30 dabei vorzugsweise Spezifität für die Samen oder die Plastiden, wie z.B. die Chloroplasten, Chromoplasten und/oder Leukoplasten, der Pflanze. Das Transitpeptid lenkt die exprimierte HPPD-Aktivität an den gewünschten Zielort in der Pflanze und wird nach dessen Erreichen vom HPPD-Proteinteil vorzugsweise
35 proteolytisch abgespalten. Die kodierende Transitpeptid-Sequenz befindet sich im erfindungsgemäßen Expressionskonstrukt vorzugsweise 5'-stromaufwärts von der kodierenden HPPD-Sequenz.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stehen die
40 kodierende HPPD-Sequenz und die anti-HGD-Sequenz jeweils unter der genetischen Kontrolle eines pflanzenspezifischen Promotors.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Expressionskassetten umfassen eine kodierende HPPD-Nukleinsäuresequenz, welche für
45 ein Protein, enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:15 oder ein funktionelles Äquivalent davon kodiert, oder die eine Nukleinsäuresequenz von einschließlich Nukleotid in Position 8

bis einschließlich Nukleotid in Position 1153 gemäß SEQ ID NO:14 oder ein funktionelles Äquivalent davon umfaßt.

Die anti-HGD-Nukleinsäuresequenz kann z.B. die in
5 antisense-Orientierung insertierte kodierende Nukleinsäuresequenz von Homogentisat-Dioxygenase oder ein funktionales Fragment davon enthalten. Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Expressionskassetten umfaßt eine HGD-Sequenzmotiv gemäß SEQ ID NO:1 in antisense-Orientierung. Dies führt zur vermehrten
10 Transkription von Nukleinsäuresequenzen in der transgenen Pflanze, welche komplementär zur endogenen kodierenden HGD-Sequenz oder einem Teil davon sind und mit dieser auf DNA- oder RNA-Ebene hybridisieren.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft rekombinante Vektoren, umfassend wenigstens eine Expressionskassette gemäß obiger Definition. Beispiele erfindungsgemäßer Vektoren umfassen wenigstens ein Expressionskonstrukt folgenden Typs:

20 5'-Pflanzenspezifischer Promotor/HPPD oder anti-HGD/Terminator-3'. Hierbei kann die kodierende HPPD-Sequenz auch durch eine kodierende Sequenz für ein Fusionsprotein aus Transitpeptid und HPPD ersetzt sein.

25 Bevorzugte Beispiele umfassen monomere Vektoren, enthaltend eines der folgenden Expressionskonstrukte:

- a) 5'-35S-Promotor/anti-HGD/OCS-Terminator-3';
- b1) 5'-LeguminB-Promotor/HPPD/NOS-Terminator-3';
- 30 b2) 5'-LeguminB-Promotor/Transitpeptid-HPPD/NOS-Terminator-3'.

Die Konstrukte a) und b) erfordern eine Kotransformation der Pflanze mit beiden Vektoren, d.h. mit a) und b1) bzw. b2).

35 Bevorzugte Beispiel umfassen außerdem binäre Vektoren, enthaltend folgendes Konstrukt:

- c1) 5'-35S-Promotor/anti-HGD/OCS-Terminator/LeguminB-Promotor/HPPD/NOS-Terminator-3'; und
- 40 c2) 5'-35S-Promotor/anti-HGD/OCS-Terminator/LeguminB-Promotor/Transitpeptid-HPPD/NOS-Terminator-3'.

Konstrukt c1) bzw. c2) erlaubt die gleichzeitige Transformation der Pflanze mit HPPD und anti-HGD.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Mikroorganismen, enthaltend wenigstens einen erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor. Bevorzugt sind solche Organismen, welche zur Infektion von Pflanzen und damit zur Übertragung der erfindungsgemäßen Konstrukte befähigt sind.

Bevorzugte Mikroorganismus sind solche aus der Gattung Agrobacterium und insbesondere der Art Agrobacterium tumefaciens.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors oder Mikroorganismus zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen insbesondere mit dem Ziel, diese zu einer verbesserten Tocopherol-Synthese zu befähigen.

15 Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Pflanze, transformiert mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor oder Mikroorganismus und transgene Zellen, Gewebe, Teile oder transgenes Vermehrungsgut von solchen Pflanzen.

20 Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen sind insbesondere ausgewählt unter Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat, wie Kresse, und den 25 verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspecies.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit verbesserter Tocopherolproduktion, wobei man Pflanzen, die zur 30 Tocopherolproduktion befähigt sind, oder Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten davon mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor oder wenigstens einem erfindungsgemäßen Mikroorganismus transformiert, die transformierten Zellen, Gewebe, Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium 35 kultiviert und gegebenenfalls aus der Kultur Pflanzen regeneriert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette, eines Vektors, eines Mikroorganismus 40 oder einer transgenen Pflanze gemäß obiger Definition zur Gewinnung von Pflanzenmetaboliten, insbesondere Tocopherolen.

Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Herstellung von Tocopherolen, das dadurch gekenn- 45 zeichnet ist, daß man aus einer Kultur einer erfindungsgemäß

transformierten Pflanze das gewünschte Tocopherol in an sich bekannter Weise isoliert.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung:

5

Die erfindungsgemäße Transformation von Pflanzen mit einem HPPD kodierenden Konstrukt führt zur Überexpression dieses Proteins und damit zur Steigerung der Homogentisatbildung. Durch gleichzeitige Transformation mit dem antisense-HGD Konstrukt wird 10 ein unerwünschter Abfluß dieses Metaboliten zu Maleylacetoacetat vermieden. Eine erhöhte Homogentisatmenge steht in der transgenen Pflanze somit zur Bildung von Tocopherolen über die Intermediate Methyl-6-phytylquinol und 2,3-Dimethyl-phytylquinol (vgl. Figur 1) zur Verfügung.

15

Unter einer Nukleotid- oder Nukleinsäure-Sequenz versteht man erfindungsgemäß beispielsweise eine genomische oder eine komplementäre DNA-Sequenz oder eine RNA-Sequenz sowie halb- oder vollsynthetische Analoga davon.

20

Die HPPD- oder anti-HGD-Nukleotidsequenzen der erfindungsgemäßen Konstrukte können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen werden oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen 25 HGD bzw. HPPD-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Die anti-HGD-Sequenz kann von einem oder mehreren Exons und/oder Introns, insbesondere Exons des HGD-Gens abgeleitet sein.

Beispielsweise können synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons 30 erzeugt werden, die von den zu transformierenden Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können anhand der Kodonnutzung in üblicher Weise für die Pflanze bestimmt werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente so manipuliert werden, daß eine Nukleotid-Sequenz mit korrekter Leserichtung und korrektem Leseraster 35 erhalten wird. Für die Verbindung der Nukleinsäure-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

40 Funktionale Äquivalente des HPPD-Gens sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch für ein Protein mit der erfindungsgemäß gewünschten Funktionen kodieren, d.h für ein Enzym mit Homogentisat-bildender Aktivität.

45 Funktionale Äquivalente von anti-HGD umfassen solche Nukleotidsequenzen welche die HGD-Enzymfunktion in der transgenen Pflanze in ausreichendem Maße unterbinden. Dies kann z.B. durch

Behinderung oder Unterbindung der HGD-Prozessierung, des Transports von HGD oder deren mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines RNA-abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination erfolgen.

5 Funktionale Äquivalente umfassen allgemein natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch 10 einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotidsequenzen.

Unter einem funktionalen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für HGD oder HPPD kodierenden Sequenz, welche 15 weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation 20 der HGD- bzw. HPPD-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

25 Funktionale Äquivalente umfassen auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist, also beispielsweise solche HPPD-Gene welche für eine HPPD-Variante mit niedrigerer oder höherer enzymatischer Aktivität als der des Ursprungsgens 30 kodieren.

Außerdem sind artifizielle Nukleinsäuresequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der 35 Pflanze durch Überexpression des HPPD-Gens oder Expression einer anti-HGD-Sequenz in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen Nukleotid-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die HGD- bzw. HPPD-Aktivität aufweisen oder durch in 40 vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende Nukleotid-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch 45 Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln. Um unerwünschte pflanzliche Regulationsmechanismen zu umgehen, kann man

beispielsweise ausgehend von der Aminosäuresequenz einer bakteriellen HPPD und unter Berücksichtigung der pflanzlichen Kodon-Nutzung DNA-Fragmente rückübersetzen und daraus die vollständige, für einen Einsatz in der Pflanze optimierte exogene 5 HPPD-Sequenz herstellen. Daraus wird ein HPPD-Enzym exprimiert, welches der pflanzlichen Regulation nicht oder nur unzureichend zugänglich ist, wodurch die Überexpression von Enzymaktivität voll zur Geltung gelangen kann.

10 Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind Sequenzen zu nennen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins z.B. ein HPPD-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer 15 Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz, mit deren Hilfe ein Nachweis der HPPD-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das HPPD-Protein an den gewünschten Wirkort 20 leitet.

Eine Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung wenigstens einer Verbindung aus der Gruppe der Tocopherole und Tocotrienole gemäß obiger 25 Definition in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

30 Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe aber auch der Samen, so daß eine blattspezifische und/oder samenspezifische Expression insbesondere des HPPD-Gens und gegebenenfalls von anti-HGD sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das 35 Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare 40 Expression wünschenswert sein.

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthaltenen regulativ Nukleinsäuresequenzen steuern die Expression der kodierenden Sequenz n (wie der HPPD-Sequenz, gegebenenfalls 45 fusioniert mit einer Transitpeptid-Sequenz) und der Antisense-

- Sequenz (anti-HGD). Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentiellen Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz oder der antisense-Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind weitere, von den Transitpeptid kodierenden Sequenzen verschiedene, Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten; sowie Translationsverstärker wie die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711), und dergleichen.
- 20 Geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalitin-Synthase)-Terminator.
- 30 Als Promotoren für die Expressionskassetten ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202). Ein weiteres Beispiel eines geeigneten Promotors ist der LeguminB-Promotor (Accessionnr. X03677).
- 45 Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann.

10

Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP-A-0388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können ebenfalls verwendet werden.

10 Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245). Beispiele für samenspezifische Promotoren sind der Phaseolin-Promotor (US 5504200), der USP-Promotor (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder der LEB4-Promotor (Fiedler, U. et al., Biotechnology (NY) (1995), 13 (10) 1090) zusammen mit dem LEB4-Signalpeptid.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten anti-HDG- bzw. 25 HPPD-Nukleotidsequenz, gegebenenfalls einer für eine Transitpeptid kodierenden Sequenz, welche vorzugsweise zwischen dem Promotor und der HPPD-Sequenz angeordnet ist, sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie 30 beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in 35 Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Wie bereits erwähnt, können auch Expressionskassetten verwendet 40 werden, deren DNA-Sequenz für ein HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Als Beispiel können genannt werden: Chloroplasten-spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation HPPD-Gens in die Chloroplasten vom HPPD-Teil 45 enzymatisch abgespalten werden.

11

Insbesondere ist zu nennen das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kI inen Untereinheit der RubisCO oder der Ferredoxin:NADP 5 Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion 10 dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp.

15

Promotor, Terminator sowie die anderen regulativen Elemente können sowohl nativ (homolog) als auch fremdartig (heterolog) zur Wirtspflanze sein.

20 Ferner können genetische Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, im Rahmen der Erforschung eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie z.B. Transitionen und Transversionen, in 25 Frage kommen, können an sich bekannte Techniken, wie in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Durch Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "blunt ends" können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur 30 Verfügung gestellt werden.

Die erforschungsgemäßen Expressionskassetten werden bevorzugt in geeignete Transformationsvektoren insertiert. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and 35 Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

Vorzugsweise werden sie in einen Vektor, wie beispielsweise pBin19, pBinAR, pPZP200 oder pPTV, kloniert, der geeignet ist, 40 Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Die mit einem solchen Vektor transformierten Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer 45 Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors

12

for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38.

- 5 Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird 10 als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die 15 Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die 20 Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. 25 Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende 25 Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien 30 können, ebenfalls in bekannter Weise, zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, 35 z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, 40 transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, 45 Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die

13

verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies. Pflanzen im Sinne der Erfahrung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Die Erfahrung wird nun in den folgenden Ausführungsbeispielen 5 unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt:

- Figur 1 eine schematische Darstellung des
10 Tocopherolbiosyntheseweges in Pflanzen; PP steht dabei für Pyrophosphat; wird in der Pflanze Homogentisat mit Geranyl-geranyl-PP umgesetzt (nicht gezeigt) so werden in analoger Weise die entsprechenden Tocotrienole gebildet;
- Figur 2 einen binären Transformations-Vektor, welcher die HPPDop
15 in Samen transformierter Pflanzen exprimiert und gleichzeitig die Expression der endogenen HGD unterdrückt: A = 35S-Promotor; B = HGD in antisense-Orientierung; C = OCS Terminator; D = Legumin B-Promotor; E = Transitpeptid der FNR; F = HPPDop; G = NOS-Terminator;
- 20 Figur 3 Konstruktionsschemata der HPPD kodierenden Plasmide pUC19HPPDop und pCRScriptHPPDop;
- Figur 4 Konstruktionsschemata der antiHGD kodierenden Plasmide
25 pBinARHGDanti und pCRScriptHGDanti; und
- Figur 5 Konstruktionsschemata der Transformationsvektoren
pPTVHGDanti und pPZP200HPPD.

30 Allgemeine Methoden:

a) Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfahrung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, AgaroseGelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden 40 wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

45

b) Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma Licor (Vertrieb durch 5 MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Beispiel 1: Klonierung einer Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) mit für Expression in *Brassica napus* optimierter

10 DNA-Sequenz

Die Aminosäuresequenz der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) aus *Streptomyces avermitilis* (Accessionnr. U11864) wurde unter Berücksichtigung der Codonverwendung in *Brassica napus* (Raps) in 15 eine DNA-Sequenz zurück übersetzt. Die Codonusage wurde mittels der Datenbank <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/index.html> bestimmt. Die abgeleitete Sequenz wurde unter Anheftung von SalI Schnittstellen durch Ligation überlappender Oligonukleotide mit anschließender PCR-Amplifikation (Rouwendal, GJA; et al, (1997) 20 PMB 33: 989-999) synthetisiert (SEQ ID NO:14). Die Richtigkeit der Sequenz des synthetischen Gens wurde durch Sequenzierung überprüft. Das synthetische Gen wurde in den Vektor pBluescript II SK+ (Stratagene).

25 Beispiel 2: Klonierung einer Homogentisat-Dioxygenase (HGD) aus *Brassica napus*

a) Isolierung von gesamt-RNA aus Blüten von *Brassica napus*

30 Von *Brassica napus* var. Westa wurden offene Blüten geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschliessend im Mörser pulverisiert und in Z6-Puffer (8 M Guanidinium-Hydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA, auf pH 7,0 mit NaOH eingestellt; versetzt mit 400 µl Mercaptoethanol/100 ml 35 Puffer unmittelbar vor Gebrauch) aufgenommen. Die Suspension wurde dann in Reaktionsgefässe überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 15000 U wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1N Essigsäure 40 und 0,7 Volumen Ethanol (absolut) die RNA gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst in 3M Natriumacetatlösung und nach einer weiteren Zentrifugation in 70 % Ethanol gewaschen. Anschliessend wurde das Pellet in DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser gelöst und die RNA-Konzentration 45 photometrisch bestimmt.

b) Herstellung von cDNA aus gesamt RNA aus Blüten von *Brassica napus*

- 20 µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 3,3 µl 3M
5 Natriumacetatlösung, 2 µl 1M Magnesiumsulfatlösung versetzt und auf 10 µl Endvolumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde 1 µl RNase-freie DNase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37 Grad inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol 10 gefällt und das Pellet in 100 µl DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 µg RNA aus dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco BRL) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

c) PCR-Amplifikation eines Teilfragments der HGD aus *Brassica napus*

- Durch Vergleich der DNA-Sequenzen der bekannten Homogentisat-Dioxygenasen (HGD) aus *Arabidopsis thaliana* (Accessionnr. U80668), *Homo sapiens* (Accessionnr. U63008) und *Mus musculus* (Accessionnr. U58988) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine SalI und am 3'-Ende eine Asp718 Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz:

25 GTCGACGGNCCNATNGGNGCNAANGG (SEQ ID NO:2),

beginnend mit der Base 661 des *Arabidopsis*-Gens. Das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz:

30 GGTACCTCRAACATRAANGCCATNGTNCC (SEQ ID NO:3),

beginnend mit der Base 1223 des *Arabidopsis*-Gens, wobei N jeweils Inosin bedeutet und R für den Einbau von A oder G in das Oligonukleotid steht.

35

Die PCR-Reaktion wurde mit der Taq-Polymerase von TAKARA nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Template wurden 0,3 µg der cDNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

40 1 Zyklus: 94 Grad 1 min
5 Zyklen: 94 Grad 4 sec
50 Grad 30 sec
72 Grad 1 min
5 zyklen: 94 Grad 4 sec
45 48 Grad 30 sec
72 Grad 1 min
25 Zyklen: 94 Grad 4 sec

NAE 981/99/K; 11.08.99; 58/cb

M/40226

16

| | |
|-----------|---------------------|
| 46 Grad | 30 sec |
| 72 Grad | 1 min |
| 1 Zyklus: | 72 Grad 30 min |

5 Das Fragment wurde mittels NucleoSpin Extract (Machery und Nagel) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor pGEMT (Promega) kloniert.

Die Richtigkeit des Fragments wurde durch Sequenzierung
10 überprüft.

Beispiel 3: Herstellung eines Pflanzentransformations-Konstrukts zur Überexpression der HPPD mit optimierter DNA-Sequenz (HPPDop) und Ausschaltung der HGD

15 Zur Herstellung von Pflanzen, welche die HPPDop in Samen exprimieren und in denen die Expression der endogenen HGD mittels antisense-Technik unterdrückt ist, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Figur 2, Konstrukt 20 VI).

a) Herstellung einer HPPDop-Expressionskassette

Dazu wurden zunächst die Komponenten der Kassette zur Expression 25 der HPPDop, bestehend aus dem LeguminB-Promotor (Accessionnr. X03677), dem Transitpeptid der Ferredoxin:NADP+ Oxidoreduktase aus Spinat (FNR; Jansen, T, et al (1988) Current Genetics 13, 517-522) und dem NOS-Terminator (enthalten im pBI101 Accessionnr. U12668) mittels PCR mit den benötigten Restriktionsschnittstellen 30 versehen.

Der Legumin-Promotor wurde aus dem Plasmid plePOCS (Bäumlein, H, et al. (1986) Plant J. 24, 233-239) mit dem stromaufwärts-Oligonukleotid:

35 GAATTCGATCTGTCGTCTCAAACTC (SEQ ID NO: 4)

und dem stromabwärts-Oligonukleotid:

40 GGTACCGTGATAGTAAACAACTAATG (SEQ ID NO: 5)

mittels PCR amplifiziert und in den Vektor PCR-Script (Stratagene) nach Herstellerangaben kloniert.

45

17

Das Transitpeptid wurde aus dem Plasmid pSK-FNR (Andrea Babette Regierer "Molekulargenetische Ansätze zur Veränderung der Phosphat-Nutzungseffizienz von höheren Pflanzen", P+H Wissenschaftlicher Verlag, Berlin 1998 ISBN: 3-9805474-9-3) mittels PCR mit dem 5'-Oligonukleotid:

ATGGTACCTTTTGATCAAACCTATCTTCATAG (SEQ ID NO: 6)

und dem 3'-Oligonukleotid:

10

ATGTCGACCCGGGATCCAGGGCCCTGATGGGTCCCATTTC (SEQ ID NO: 7)

amplifiziert.

15 Der NOS-Terminator wurde aus dem Plasmid pBI101 (Jefferson, R.A., et al (1987) EMBO J. 6 (13), 3901-3907) mittels PCR mit dem 5'-Oligonukleotid:

GTCGACGAATTCCCCGAATCGTTC: (SEQ ID NO: 8)

20

und dem 3'-Oligonukleotid

AAGCTTCCGATCTAGTAACATAGA (SEQ ID NO: 9)

25 amplifiziert.

Das Amplikon wurde jeweils in den Vektor pCR-Script (Stratagene) nach Herstellerangaben kloniert.

30 Für die Expressionskassette wurde zunächst der NOS-Terminator als SalI/HindIII-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pUC19-Vektor (Yanisch-Perron, C., et al (1985) Gene 33, 103-119) umkloniert. In dieses Plasmid wurde anschließend das Transitpeptid als Asp718/SalI-Fragment eingeführt. Der 35 Legumin-Promotor wurde dann als EcoRI/Asp718 Fragment einkloniert. Das Gen HPPDop wurde als SalI-Fragment in dieses Konstrukt eingeführt (Figur 3, Konstrukt III).

Die fertige Kassette in pUC19 wurde als Template für eine PCR 40 verwendet, wozu für den Leguminpromotor das Oligonukleotid:

AAGCTTGATCTGTCGCTCAAACTC (SEQ ID NO: 10)

und für den Nos-Terminator das Oligonukleotid:

45

AAGCTTCCGATCTAGTAACATAGA (SEQ ID NO: 11)

18

verwendet wurden. Das Amplikon wurde in pCR-Script kloniert und pCR-ScriptHPPDop genannt (Figur 3, Konstrukt IV).

b) Herstellung einer antiHGD-Expressionskassette

5

Für die Ausschaltung der HGD mit antisense-Technik wurde das Genfragment als SalI/Asp718-Fragment in den Vektor pBinAR (Höfgen, R. und Willmitzer, L., (1990) Plant Sci. 66: 221-230) kloniert, in dem der 35S-Promotor und der OCS-Terminator vorliegen (Figur 4, Konstrukt I). Das Konstrukt diente als Vorlage für eine PCR Reaktion mit dem Oligonukleotid:

ATTCTAGACATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA (SEQ ID NO: 12),

15 spezifisch für die 35S-Promotor-Sequenz; und dem Oligonukleotid:

ATTCTAGAGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG (SEQ ID NO: 13).

20 Das Amplikon wurde in den Vektor PCR-Script (Stratagene) kloniert und HGDanti genannt (Figur 3, Konstrukt II).

c) Herstellung des binären Vektors

25 Zur Erstellung eines binären Vektors zur Raps-Transformation wurde zunächst das Konstrukt HGDanti aus pCRScriptHGDanti als XbaI-Fragment in den Vektor pPTV (Becker, D., (1992) PMB 20, 1195-1197) kloniert (Abbildung 5, Konstrukt V). In dieses Plasmid wurde das Konstrukt LegHPPDop aus pCRScriptHPPDop als 30 HindIII-Fragment eingefügt. Dieses Plasmid wurde mit pPTVHPPD/HGDanti bezeichnet (Figur 2, Konstrukt VI).

Beispiel 4: Herstellung von Konstrukten zur Kotransformation zur Überexpression von HPPDop und Ausschaltung von HGD in *Brassica napus* Pflanzen

Zur Kotransformation von Pflanzen mit HPPDop und antiHGD wurde das Konstrukt LeguminB-Promotor/Tansitpeptid/HPPDop/NOS aus dem Vektor pCRScriptHPPDop (Figur 3, Konstrukt IV) als 40 HindIII-Fragment herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor ppZP200 (Hajdukiewicz, P., et al., (1994) PMB 25(6): 989-94) eingefügt (Figur 5, Konstrukt VII). Dieses Plasmid diente später zur Kotransformation von Pflanzen zusammen mit dem Vektor pPTVHGDanti (Figur 5, Konstrukt V) aus Beispiel 3 45 c.).

Beispiel 5: Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen

Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., Hrsg., Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

Die Transformation erfolgte mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA105 (Li, X.Q., et al., PMB (1992) 20, 1037). Zur Transformation wurde entweder das oben genannte Plasmid pPTVHPPDopHGDanti (Figur 2) oder nach Anzucht gemischte Kulturen von Agrobakterien mit den Plasmiden pPTVHGdanti und pPZP200HPPDop (Figur 5) verwendet.

Samen von *Brassica napus* var. Westar wurden mit 70% Ethanol (v/v) oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit steriles Wasser jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate wurden 30 Minuten mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einem 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktionsmedium wurden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

Von den *Agrobacterium* Stämmen wurden Übernachtkulturen bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20mg/l) angesetzt, davon 2ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. Zur Kotransformation wurde die Lösung der beiden Stämme zu gleichen Teilen vermischt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml *Agrobacterium*-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 20 min inkubiert. Die Agrobakterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explantate 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 45 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des

20

Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explantate zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explantaten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium 5 mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explantate in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Phosphinotricin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen 10 Leukopor verschlossen und bei 25 °C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur 15 Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., Hrsg., Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

20

25

30

35

40

45

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: .
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 67056

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Homogentisat-Dioxygenase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 575 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Brassica napus

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:1..6
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/function=
"Restriktionsschnittstelle"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE:570..575

22

(D) SONSTIGE ANGABEN:/function=
 "Restriktionsschnittstelle"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|--|-----|
| GTCGACGGGC CGATGGGGC GAAGGGTCTT GCTGCACCAA GAGATTTCT TGCACCAACG | 60 |
| GCATGGTTG AGGAAGGGCT ACGGCCTGAC TACACTATTG TTCAGAAGTT TGGCGGTGAA | 120 |
| CTCTTTACTG CTAAACAAGA TTTCTCTCCG TTCAATGTGG TTGCCTGGCA TGGCAATTAC | 180 |
| GTGCCTTATA AGTATGACCT GCACAAGTTC TGTCCATACA ACACTGTCCCT TGTAGACCAT | 240 |
| GGAGATCCAT CTGTAAATAC AGTTCTGACA GCACCAACGG ATAAACCTGG TGTGGCCTTG | 300 |
| CTTGATTTG TCATATTCCC TCCTCGTTGG TTGGTTGCTG AGCATACCTT TCGACCTCCT | 360 |
| TACTACCATC GTAACTGCAT GAGTGAATTG ATGGGCCTAA TCTATGGTGC TTACGAGGCC | 420 |
| AAAGCTGATG GATTCTACC TGGTGGCGCA AGTCTTCACA GTTGTATGAC ACCTCATGGT | 480 |
| CCAGATACAA CCACATACGA GGCGACGATT GCTCGTGTAA ATGCAATGGC TCCTTATAAG | 540 |
| CTCACAGGCA CCATGGCCTT CATGTTGAG GTACC | 575 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:9
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:12

23

(D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:15
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:18
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:21
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:24
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GTGACGGNC CNATNGGN NC NAANGG

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:18
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(ix) MERKMALE:

24

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:24
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modified_base
- (B) LAGE:27
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/mod_base= i

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGTACCTCRA ACATRAANGC CATNGTNCC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GAATTTCGATC TGTCGTCTCA AACTC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGTACCGTGA TAGTAAACAA CTAATG

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ATGGTACCTT TTTGCATAA ACTTATCTTC ATAG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ATGTCGACCC GGGATCCAGG GCCCTGATGG GTCCCATTTC CCC

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare

26

- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GTCGACGAAT TTCCCCGAAT CGTTC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAGCTTCCGA TCTAGTAACA TAGA

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

27

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

AAGCTTGATC TGTCGTCTCA AACTC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

AAGCTTCCGA TCTAGTAACA TAGA

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

ATTCTAGACA TGGAGTCAAA GATTCAAATA GA

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

28

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATTCTAGAGG ACAATCAGTA ATTGAAACGG AG

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 1159 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:1..6
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function=
"Restriktionsschnittstelle"

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:8..1153

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:1154..1159
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function=
"Restriktionsschnittstelle"

29

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GTCGACT ATG ACT CAA ACT ACT CAT CAT ACT CCA GAT ACT GCT AGA CAA
 Met Thr Gln Thr Thr His His Thr Pro Asp Thr Ala Arg Gln
 1 5 10

49

GCT GAT CCT TTT CCA GTT AAG GGA ATG GAT GCT GTT TTC GCT GTT
 Ala Asp Pro Phe Pro Val Lys Gly Met Asp Ala Val Val Phe Ala Val
 15 20 25 30

97

GGA AAC GCT AAG CAA GCT GCT CAT TAC TAC TCT ACT GCT TTC GGA ATG
 Gly Asn Ala Lys Gln Ala Ala His Tyr Tyr Ser Thr Ala Phe Gly Met
 35 40 45

145

CAA CTT GTT GCT TAC TCT GGA CCA GAA AAC GGA TCT AGA GAA ACT GCT
 Gln Leu Val Ala Tyr Ser Gly Pro Glu Asn Gly Ser Arg Glu Thr Ala
 50 55 60

193

TCT TAC GTT CTT ACT AAC GGA TCT GCT AGA TTC GTT CTT ACT TCT GTT
 Ser Tyr Val Leu Thr Asn Gly Ser Ala Arg Phe Val Leu Thr Ser Val
 65 70 75

241

ATT AAG CCA GCT ACC CCA TGG GGA CAT TTC CTT GCT GAT CAC GTT GCT
 Ile Lys Pro Ala Thr Pro Trp Gly His Phe Leu Ala Asp His Val Ala
 80 85 90

289

GAA CAC GGA GAT GGA GTT GTT GAT CTT GCT ATT GAA GTT CCA GAT GCT
 Glu His Gly Asp Gly Val Val Asp Leu Ala Ile Glu Val Pro Asp Ala
 95 100 105 110

AGA GCT GCT CAT GCT TAC GCT ATT GAA CAT GGA GCT AGA TCT GTT GCT
 Arg Ala Ala His Ala Tyr Ala Ile Glu His Gly Ala Arg Ser Val Ala
 115 120 125

337

385

GAA CCA TAC GAA CTT AAG GAT GAA CAT GGA ACT GTT GTT CTT GCT GCT
 Glu Pro Tyr Glu Leu Lys Asp Glu His Gly Thr Val Val Leu Ala Ala
 130 135 140

433

ATT GCT ACT TAC GGA AAG ACT AGA CAT ACT CTT GAT AGA ACT GGA
 Ile Ala Thr Tyr Gly Lys Thr Arg His Thr Leu Val Asp Arg Thr Gly
 145 150 155

481

TAC GAT GGA CCA TAC CTT CCA GGA TAC GTT GCT GCT GCT CCA ATT GTT
 Tyr Asp Gly Pro Tyr Leu Pro Gly Tyr Val Ala Ala Pro Ile Val
 160 165 170

529

GAA CCA CCA GCT CAT AGA ACC TTC CAA GCT ATT GAC CAT TGT GTT GGT
 Glu Pro Pro Ala His Arg Thr Phe Gln Ala Ile Asp His Cys Val Gly

577

30

175

180

185

190

AAC GTT GAA CTC GGA AGA ATG AAC GAA TGG GTT GGA TTC TAC AAC AAG
 Asn Val Glu Leu Gly Arg Met Asn Glu Trp Val Gly Phe Tyr Asn Lys
 195 200 205

625

GTT ATG GGA TTC ACT AAC ATG AAG GAA TTC GTT GGA GAT GAT ATT GCT
 Val Met Gly Phe Thr Asn Met Lys Glu Phe Val Gly Asp Asp Ile Ala
 210 215 220

673

ACT GAG TAC TCT GCT CTT ATG TCT AAG GTT GCT GAT GGA ACT CTT
 Thr Glu Tyr Ser Ala Leu Met Ser Lys Val Val Ala Asp Gly Thr Leu
 225 230 235

721

AAG GTT AAA TTC CCA ATT AAT GAA CCA GCT CTT GCT AAG AAG AAG TCT
 Lys Val Lys Phe Pro Ile Asn Glu Pro Ala Leu Ala Lys Lys Ser
 240 245 250

769

CAG ATT GAT GAA TAC CTT GAG TTC TAC GGA GGA GCT GGA GTT CAA CAT
 Gln Ile Asp Glu Tyr Leu Glu Phe Tyr Gly Ala Gly Val Gln His
 255 260 265 270

817

ATT GCT CTT AAC ACT GGA GAT ATC GTG GAA ACT GTT AGA ACT ATG AGA
 Ile Ala Leu Asn Thr Gly Asp Ile Val Glu Thr Val Arg Thr Met Arg
 275 280 285

865

GCT GCA GGA GTT CAA TTC CTT GAT ACT CCA GAT TCT TAC TAC GAT ACT
 Ala Ala Gly Val Gln Phe Leu Asp Thr Pro Asp Ser Tyr Tyr Asp Thr
 290 295 300

913

CTT GGT GAA TGG GTT GGA GAT ACT AGA GTT CCA GTT GAT ACT CTT AGA
 Leu Gly Glu Trp Val Gly Asp Thr Arg Val Pro Val Asp Thr Leu Arg
 305 310 315

961

GAA CTT AAG ATT CTT GCT GAT AGA GAT GAA GAT GGA TAC CTT CTT CAA
 Glu Leu Lys Ile Leu Ala Asp Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Leu Leu Gln
 320 325 330

1009

ATC TTC ACT AAG CCA GTT CAA GAT AGA CCA ACT GTG TTC TTC GAA ATC
 Ile Phe Thr Lys Pro Val Gln Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Glu Ile
 335 340 345 350

1057

ATT GAA AGA CAT GGA TCT ATG GGA TTC GGA AAG GGT AAC TTC AAG GCT
 Ile Glu Arg His Gly Ser Met Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Lys Ala
 355 360 365

1105

CTT TTC GAA GCT ATT GAA AGA GAA CAA GAG AAG AGA GGA AAC CTT TAG

1153

31

Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Glu Lys Arg Gly Asn Leu *

370 375 380

1159

GTCGAC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 382 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Met Thr Gln Thr Thr His His Thr Pro Asp Thr Ala Arg Gln Ala Asp
1 5 10 15

Pro Phe Pro Val Lys Gly Met Asp Ala Val Val Phe Ala Val Gly Asn
20 25 30

Ala Lys Gln Ala Ala His Tyr Tyr Ser Thr Ala Phe Gly Met Gln Leu
35 40 45

Val Ala Tyr Ser Gly Pro Glu Asn Gly Ser Arg Glu Thr Ala Ser Tyr
50 55 60
Val Leu Thr Asn Gly Ser Ala Arg Phe Val Leu Thr Ser Val Ile Lys
65 70 75 80

Pro Ala Thr Pro Trp Gly His Phe Leu Ala Asp His Val Ala Glu His
85 90 95

Gly Asp Gly Val Val Asp Leu Ala Ile Glu Val Pro Asp Ala Arg Ala
100 105 110

Ala His Ala Tyr Ala Ile Glu His Gly Ala Arg Ser Val Ala Glu Pro
115 120 125

Tyr Glu Leu Lys Asp Glu His Gly Thr Val Val Leu Ala Ala Ile Ala
130 135 140

Thr Tyr Gly Lys Thr Arg His Thr Leu Val Asp Arg Thr Gly Tyr Asp
145 150 155 160

Gly Pro Tyr Leu Pro Gly Tyr Val Ala Ala Pro Ile Val Glu Pro
165 170 175

32

Pro Ala His Arg Thr Phe Gln Ala Ile Asp His Cys Val Gly Asn Val
180 185 190

Glu Leu Gly Arg Met Asn Glu Trp Val Gly Phe Tyr Asn Lys Val Met
195 200 205

Gly Phe Thr Asn Met Lys Glu Phe Val Gly Asp Asp Ile Ala Thr Glu
210 215 220

Tyr Ser Ala Leu Met Ser Lys Val Val Ala Asp Gly Thr Leu Lys Val
225 230 235 240

Lys Phe Pro Ile Asn Glu Pro Ala Leu Ala Lys Lys Ser Gln Ile
245 250 255

Asp Glu Tyr Leu Glu Phe Tyr Gly Gly Ala Gly Val Gln His Ile Ala
260 265 270

Leu Asn Thr Gly Asp Ile Val Glu Thr Val Arg Thr Met Arg Ala Ala
275 280 285

Gly Val Gln Phe Leu Asp Thr Pro Asp Ser Tyr Tyr Asp Thr Leu Gly
290 295 300

Glu Trp Val Gly Asp Thr Arg Val Pro Val Asp Thr Leu Arg Glu Leu
305 310 315 320

Lys Ile Leu Ala Asp Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Ile Phe
325 330 335

Thr Lys Pro Val Gln Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Glu Ile Ile Glu
340 345 350

Arg His Gly Ser Met Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Lys Ala Leu Phe
355 360 365

Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Glu Lys Arg Gly Asn Leu *
370 375 380

Patentansprüche

1. Expressionskassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle
5 regulativer Nukleinsäuresequenzen
 - a) die kodierende Nukleinsäuresequenz für 4-Hydroxyphenyl-pyruvat-Dioxygenase (HPPD) oder für ein funktionales Äquivalent davon; und/oder
10
 - b) eine Nukleinsäuresequenz (anti-HGD), welche zu einer antisense-Nukleinsäuresequenz transkribierbar ist, die zur Inhibition der Homogentisat-Dioxygenase (HGD) Aktivität befähigt ist.
15
2. Expressionskassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die kodierende HPPD-Sequenz mit der kodierenden Sequenz
eines Pflanzenorganell-spezifischen Transitpeptids funktional
verknüpft ist.
20
3. Expressionskassette nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß die kodierende HPPD-Sequenz und die
anti-HGD-Sequenz jeweils unter der genetischen Kontrolle
eines pflanzenspezifischen Promotors stehen.
25
4. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende
HPPD-Nukleinsäuresequenz für ein Protein enthaltend eine
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:15 oder ein funktionales
30 Äquivalent davon kodiert oder eine Nukleinsäuresequenz von
Rest 8 bis Rest 1153 gemäß SEQ ID NO:14 oder ein funktionales
Äquivalent davon umfaßt.
5. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
35 dadurch gekennzeichnet, daß sie ein HGD-Sequenzmotiv gemäß
SEQ ID NO:1 in antisense-Orientierung umfaßt.
6. Rekombinanter Vektor, umfassend wenigstens eine
Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
40
7. Vektor nach Anspruch 6, umfassend wenigstens ein
Expressionskonstrukt des Typs:
5'-Pflanzenspezifischer Promotor/HPPD oder anti-HGD/
45 Terminator-3',

wobei die Einzelelemente miteinander funktional verknüpft sind und wobei HPPD gegebenenfalls für ein Fusionsprotein, umfassend ein abspaltbares Transitpeptid und ein Polypeptid mit HPPD-Aktivität, kodiert.

5

8. Vektor nach Anspruch 7, umfassend eines der folgenden Expressionskonstrukte:

10

- a) 35S-Promotor/anti-HGD/OCS-Terminator
- b) LeguminB-Promotor/HPPD/NOS-Terminator
- c) 35S-Promotor/anti-HGD/OCS-Terminator/LeguminB-Promotor/HPPD/NOS-Terminator

15

9. Mikroorganismus, enthaltend einen rekombinanten Vektor nach einem der Ansprüche 6 bis 8.

10. Mikroorganismus nach Anspruch 9 aus der Gattung Agrobacterium und insbesondere der Art Agrobacterium tumefaciens.

11. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 6 bis 8 oder eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 9 und 10 zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Pflanzen, Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile zu einer verbesserten Tocopherol-Synthese befähigt werden.
- 30
13. Transgene Pflanze, transformiert mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8 oder mit einem Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 9 und 10, oder transgene Zellen, Gewebe, Teile oder transgenes Vermehrungsgut davon.

35

14. Transgene Pflanze nach Anspruch 13, ausgewählt unter Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat, wie Kresse, und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspecies.

- 40
15. Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen nach einem der Ansprüche 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8 oder mit einem Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 9 und 10 transformiert, die transformierten Zellen, Gewebe,

Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und gegebenenfalls aus der Kultur Pflanzen regeneriert.

5 16. Verwendung einer Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 5, eines Vektors nach einem der Ansprüche 6 bis 8, eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 9 oder 10 oder einer transgenen Pflanze nach einem der Ansprüche 13 und 14 zur Gewinnung von Pflanzenmetaboliten, insbesondere Tocopherolen.

10 17. Verfahren zur Herstellung von Tocopherolen, dadurch gekennzeichnet, daß man aus einer Kultur einer transformierten Pflanze nach einem der Ansprüche 13 und 14 das Tocopherol isoliert.

20

25

30

35

40

45

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neuartige Expressionskassetten, enthaltend
5 unter genetischer Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen

- a) die kodierende Nukleinsäuresequenz für 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) oder für ein funktionales Äquivalent davon; und/oder
10 b) eine Nukleinsäuresequenz (anti-HGD), welche zu einer antisense-Nukleinsäuresequenz transkribierbar ist, die zur Inhibition der Homogentisat-Dioxygenase (HGD) Aktivität befähigt ist;

15 sowie Vektoren, die zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt geeignet sind, damit hergestellte transgene Pflanzen sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt.

20

25

30

35

40

45

Tocopherolsynthese

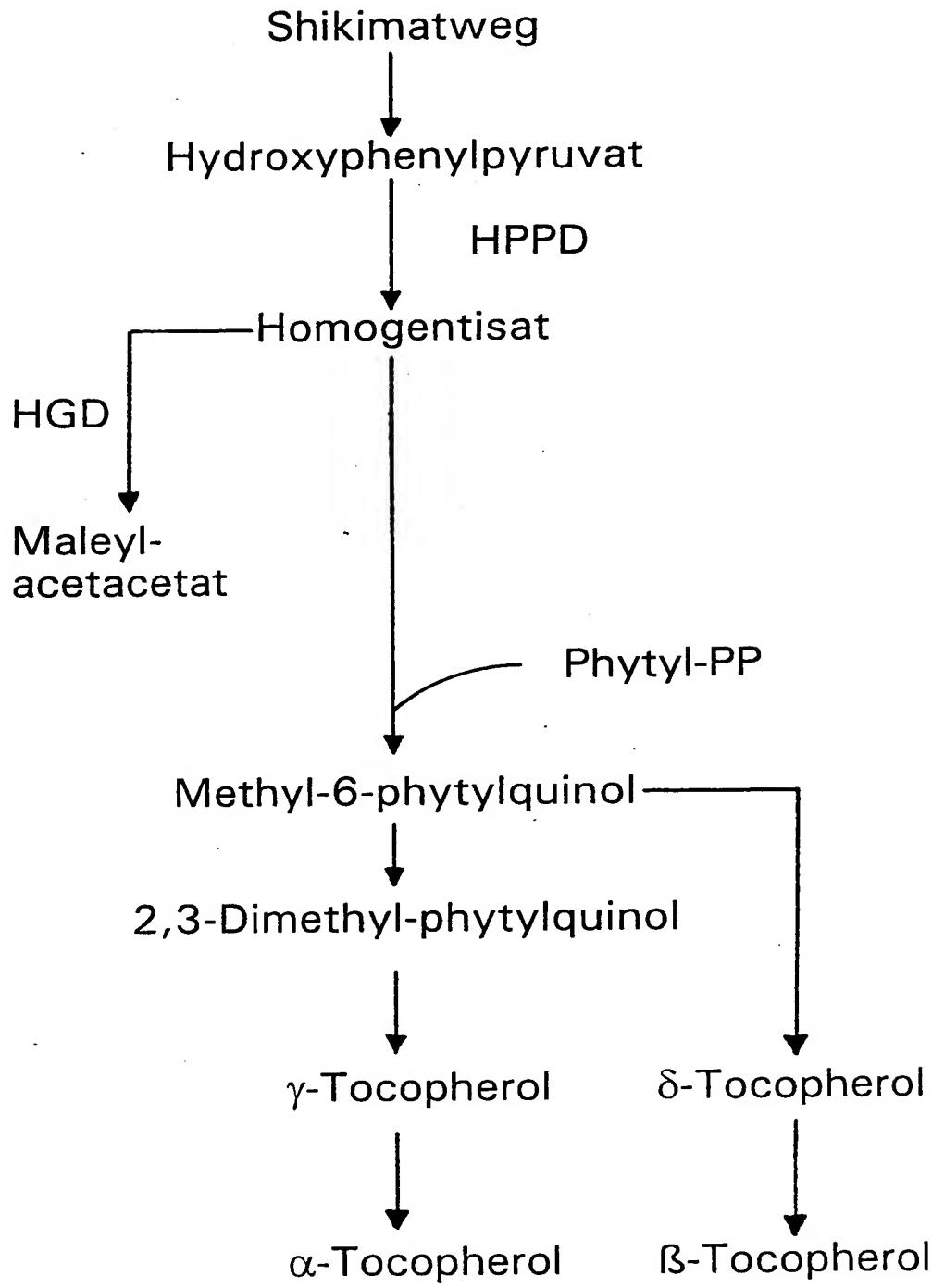


Fig.1

Fig.2

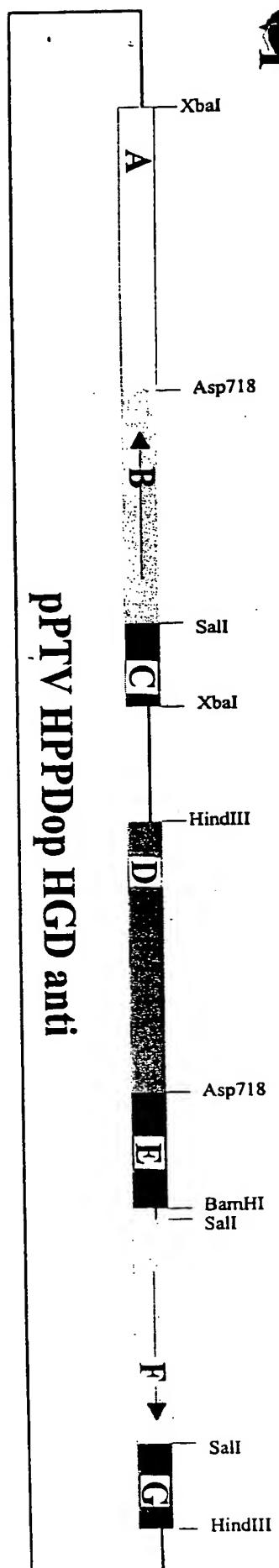
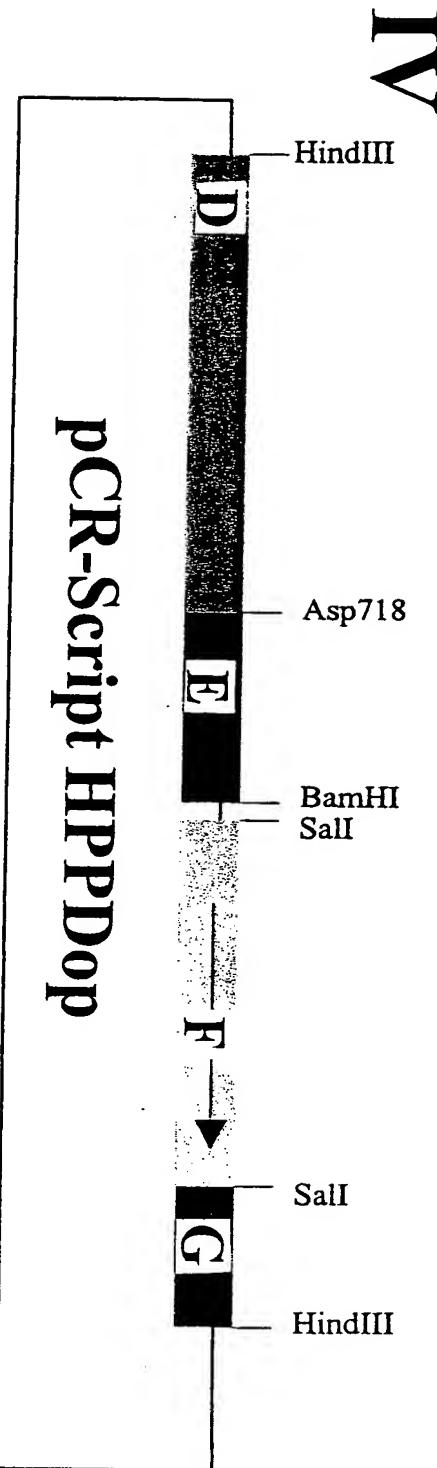
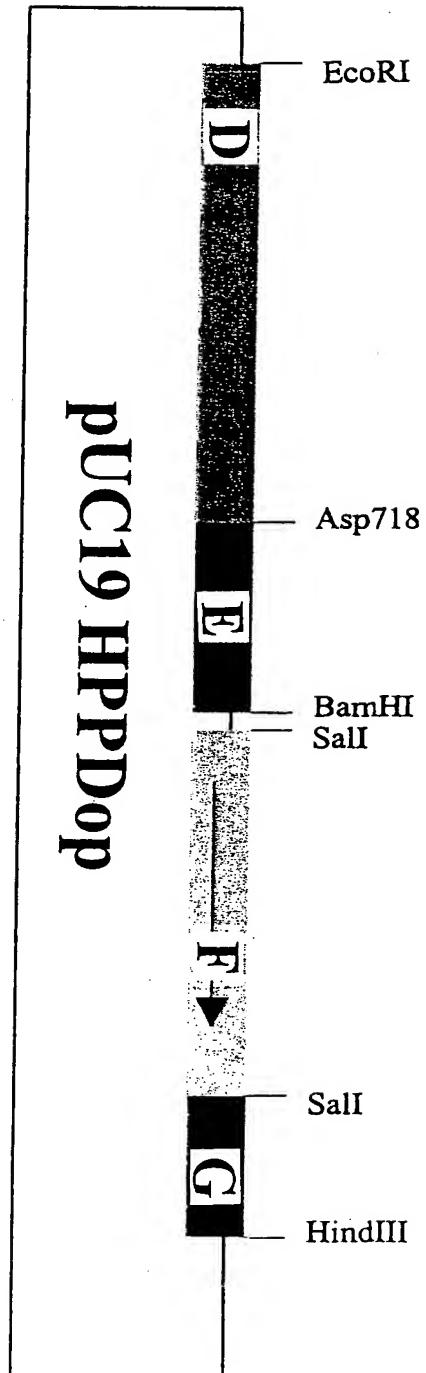


Fig.3

pCR-Script HPPDop



pUC19 HPPDop



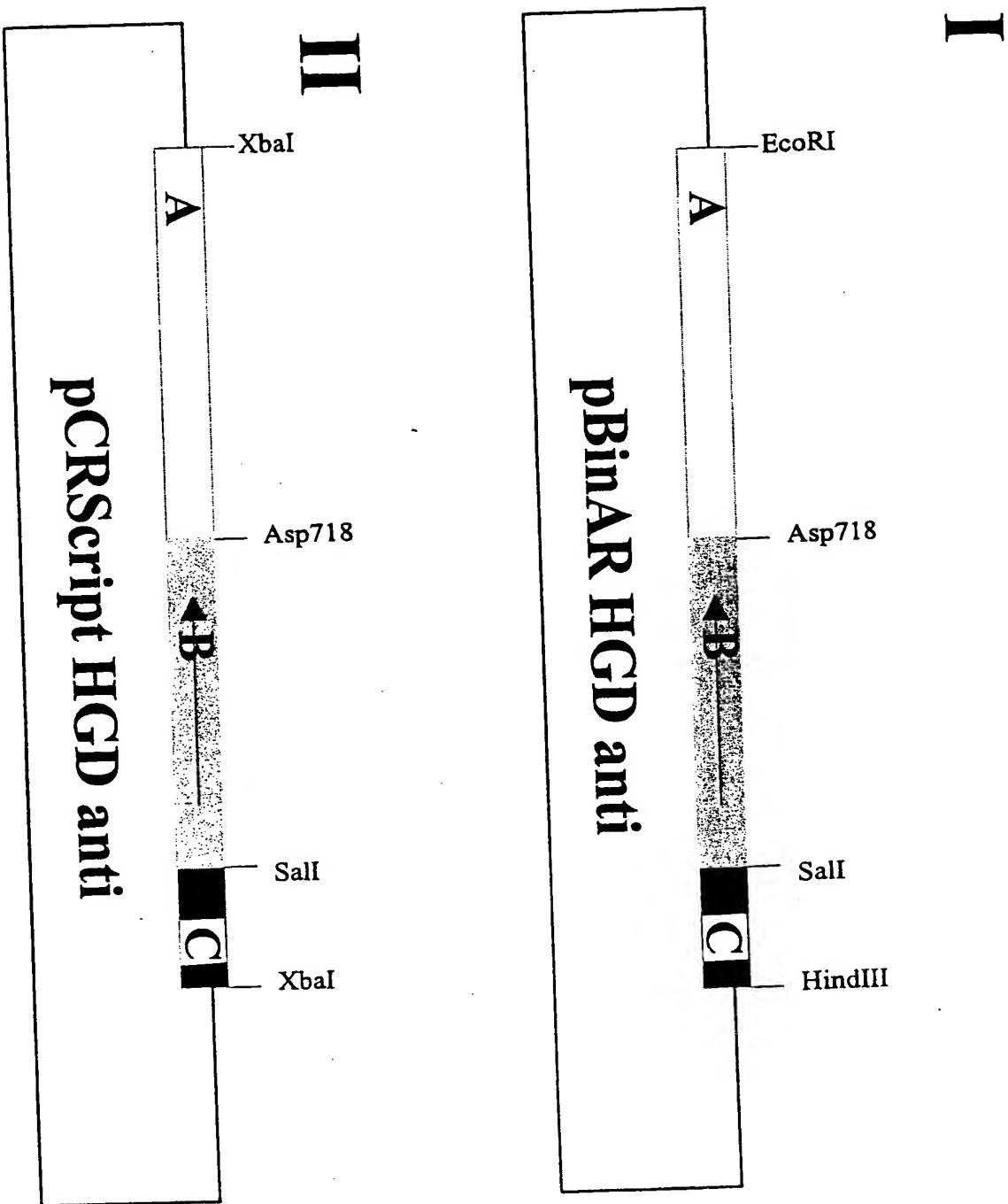


Fig.4

Fig. 5

